

Omaggio dell'a

B 9
242

CONTRIBUTO SPERIMENTALE

ALLA

LEGGE DELL' ADATTAMENTO DEI MICRORGANISMI

AI MEZZI ANTISEPTICI

RICERCHE

DEL

DOTT. ARNALDO TRAMBUSTI

Aiuto alla cattedra di Patologia Generale nel R. Istituto di Studi Superiori
in Firenze

CONTRIBUTO SPERIMENTALE ALLA LEGGE DELL'ADATTAMENTO DEI MICRORGANISMI

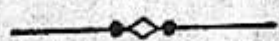
AI MEZZI ANTISETTICI

RICERCHE

DEL

DOTT. ARNALDO TRAMBUSTI

Aiuto alla cattedra di Patologia Generale nel R. Istituto di Studi Superiori
in Firenze



Non mi pare debba esser privo d'interesse il portare un piccolo contributo alla legge dell'adattamento che Carlo Darwin ha posto fra le leggi fondamentali dell'Elezione naturale, cercando di dimostrare quale può essere l'importanza biologica che l'influenza del mezzo può esercitare sugli esseri infinitamente piccoli.

Le osservazioni fatte dagli studiosi della Microbiologia, hanno provato come i microrganismi possano restare in presenza delle condizioni più diverse dell'ambiente e come essi abbiano un potere meravigliosamente sorprendente di resistenza contro le cause che tendono alla loro distruzione.

Infatti quantunque la temperatura che generalmente si confà di più alla vita del protoplasma oscilli fra 35 e 40° C (1). Frisch ha potuto vedere che alcune forme di microrganismi, fra le quali il *Bacillus anthracis* resistono a una temperatura di 110° al disotto di 0 (2) e Schumaker ha portato a una temperatura di — 113° alcuni Saccaromiceti senza che questi perdessero la loro vitalità (3).

La resistenza all'azione coagulante delle alte temperature è anche più meravigliosa. Le spore del *Bacillus subtilis* per es. si possono sviluppare benissimo dopo che sono state per un quarto d'ora a una temperatura di 100° (4) e quelle del *Ba-*

cillus butilicus e del *Bacillus amylobacter* sopportano la stessa temperatura di 100° per venti minuti (5). Così le spore del *Tyrothrix tenuis*, il cui massimo sviluppo si ha fra + 25° e + 35° resistono a una ebullizione di + 115° in un liquido alcalino (6) come quelle del *Carbonchio* possono resistere per qualche tempo a una temperatura secca di 123° (7).

E non soltanto è compatibile la vita a queste alte temperature ma si può avere per es. a + 70° la moltiplicazione di alcuni microrganismi (8).

La stessa resistenza si riscontra nei microrganismi rispetto al grado di siccità dell'ambiente, tanto che, secondo Brefeld, il *Bacillus subtilis* può resistere in un ambiente secco per un periodo di tre anni.

Nè le alte pressioni atmosferiche vincono la resistenza vitale di questi esseri. Difatti si sa dalle ricerche di Certes e Cochin (9) che alcuni lieviti sono ancora in grado di scomporre lo zucchero sotto pressioni di 300 a 400 atmosfere, ed è stato provato che può esistere un processo di putrefazione alle medesime pressioni.

L'acidità e l'alcalinità del mezzo non riescono spesso a distruggere i microrganismi. Così alcuni di essi possono resistere per qualche tempo in soluzioni di acido solforico al 2 % (10) come alle soluzioni più forti di sublimato corrosivo. Io infatti ho potuto vedere nei miei esperimenti come il *Pneumococco di Friedländer* possa vivere e moltiplicarsi in brodi peptonizzati a cui sia aggiunto il sublimato corrosivo nella proporzione di $\frac{1}{2000}$.

Essendo ormai noti, tralascio di riportare gli studi numerosissimi che si sono succeduti sulla influenza delle sostanze antisettiche sopra i microrganismi. Dalle esperienze di Bucholtz (11) che fu il primo a studiare la questione, di P. Kühn (12) di Th. Haberkorn (13) di N. Talan de la Croix (14) sino a quelle di Koch (15), di Sternberg (16) e di Ratimoff (17) e di tanti altri, si potrebbero trarre degli esempi interessantissimi comprovanti il grado di resistenza che i vari microrganismi posseggono per un dato antisettico.

Ma questi microrganismi, la cui resistenza veramente

straordinaria ai mezzi più vari non ha riscontro in nessuno degli esseri più elevati, restano essi indifferenti all' ambiente che li contiene, oppure risentono delle influenze speciali che quello può in qualche modo esercitare sopra di loro?

Li esperimenti classici fatti dal Raulin nel laboratorio di Pasteur sullo sviluppo dell' *Aspergillus niger* (18) in varie sostanze nutritive, hanno provato che questa grande resistenza dei piccoli organismi può venir meno in presenza di certe condizioni dell' ambiente.

Il Raulin difatti, che era riuscito a comporre un liquido nel quale otteneva un massimo raccolto della cultura dell' *Aspergillus niger*, aveva visto che togliendo a questo liquido la piccola dose di un sale di zinco che vi era contenuto nella proporzione di 32 milligrammi, la raccolta cadeva da 25 grammi a 2 grammi e $\frac{1}{2}$. Ma il più curioso è questo che se si aggiungeva $\frac{1}{1600000}$ di nitrato d' argento al liquido di cultura l' *Aspergillus* cessava bruscamente di vivere. E lo stesso osservatore aveva constatato l' impossibilità di ottenere una cultura di *Aspergillus* quando il liquido nutritivo era posto in un vaso d' argento, senza che la Chimica potesse trovare nel liquido la menoma traccia di questo metallo.

È dunque evidente che possono esistere nel mezzo delle condizioni speciali, le quali influiscono più o meno grandemente sulla vita degli infinitamente piccoli. Da qualche esempio che riporto qui di seguito è facile persuadersi di questa verità e si vedrà difatti come i microrganismi, date certe condizioni dell' ambiente possano subire dei cambiamenti sia nella forma, sia nella funzione loro.

Uno degli esempi più classici che si può addurre oggi a confortare la teoria di un possibile cambiamento di forma in una specie, sono gli esperimenti di Wasserzug sul *Micrococcus prodigiosus* (19). Questo autore, seminando il micrococco in brodo peptonizzato addizionato di una piccola dose di acido tartarico (4 e 5 decigm. per litro), otteneva cultura di bastoncini di 2 a 5 μ di lunghezza, spesso riuniti in filamenti da 2 a 20 articoli. Lasciando a sè queste culture, dopo 2 o 3 giorni gli articoli si accorciavano e tornano sferici (forma di streptotocco), poi si stac-

cano e si ritorna alla forma prima di micrococchi, il qual fatto coincide col sopravvenire di una reazione alcalina nel liquido di cultura. Ma se da culture giovani in cui si è ottenuta la forma bacillare, si passa di nuovo in brodi leggermente acidificati, si possono avere, dopo una quindicina di passaggi successivi, forme di bacilli e di filamenti che si mantengono stabili senza tornare alla forma primitiva.

Lo stesso risultato è stato ottenuto dal Wasserzug facendo restare per cinque minuti a una temperatura di $+ 50^{\circ}$ le culture di *Micrococcus prodigiosus* il primo e il secondo giorno di sviluppo, poi passando dalla prima provetta in una seconda che vien trattata nello stesso modo fino a ottenere, dopo 5 o 6 passaggi delle vere forme bacillari.

Il *Micrococcus prodigiosus*, che ho portato come esempio di cambiamento nella forma può servire a dimostrare anche un possibile cambiamento nella funzione.

Difatti se si coltiva il *Micrococcus prodigiosus* a una temperatura fra $+ 38^{\circ}$ e 39° , si ottiene la scomparsa del colore rosso e dell'odore di trimetilamina, qualità che il micrococco riprende subito se si riporta alla temperatura dell'ambiente, ma che non riprende più dopo 8 o 10 generazioni alla temperatura di 38° e 39° (20).

Nè insisto di più su questo argomento perchè ormai tutti conoscono come il calore e la luce esercitino una influenza considerevole sul potere patogeno dei microrganismi. Le esperienze classiche di Pasteur (21) sull'attenuazione del Carbonchio per mezzo del calore, quelle di Arloing (22) sull'attenuazione dello stesso virus per mezzo della luce e i lavori di Duclaux sulla influenza della luce sui microrganismi, dimostrano a sufficienza come l'ambiente possa modificare le funzioni più importanti e caratteristiche di un dato microrganismo.

Da tutto quello che fin qui sono andato esponendo, appare dunque chiaramente:

1° Che i microrganismi hanno la proprietà di adattarsi agli ambienti più vari e anche a quelli che sono meno favorevoli alla loro esistenza.

2° Che li stessi microrganismi risentono qualche volta

delle influenze dell'ambiente che li accoglie, tanto da subire delle modificazioni nella forma e nella funzione.

La legge di adattamento, che ho dimostrato riscontrarsi nei più semplici organismi come negli organismi complessi è stata presa come soggetto di ricerche interessantissime da un Batteriologo, il quale si è proposto di studiare l'adattamento dei microrganismi ai mezzi antisettici.

Il Kossiakoff (24) infatti, sperimentando su quattro specie: il *Tyrothrix scaber*, il *Tyrothrix tenuis*, il *Bacillus subtilis* e il *Bacillo del Carbonchio*, che egli coltivava in brodo di manzo addizionato con dosi sempre crescenti di antisettico, ha voluto ricercare quali proprietà nuove acquistassero questi microrganismi che si erano abituati a vivere in presenza di quel dato antisettico. Le conclusioni a cui è venuto l'Autore sono oltremodo interessanti, poichè egli ha potuto provare, dopo un certo numero di culture, che per uccidere quelle specie di microrganismi che si erano adattate, era necessaria una dose di antisettico maggiore che per uccidere le stesse specie che avevano vissuto in brodo puro.

Il fatto veramente importante, anche per la utilità pratica che ne può derivare dal punto di vista terapeutico, mi ha spinto a ritornare su queste ricerche per vedere:

1° Se i microrganismi si possono adattare a un dato antisettico e se adattati acquistino un potere di resistenza maggiore per quel dato antisettico.

2° Se coll' aumento di resistenza acquistato da una data specie di microrganismo, si abbiano anche delle modificazioni nella sua funzionalità.

Gli esperimenti sono stati fatti col *Carbonchio*, col *Mal rosso dei maiali*, col *Pneumococco del Friedländer*, con lo *Stafilococco piogeno aureo* e col *Colera dei polli*.

Ognuna di queste specie veniva coltivata, con ripetuti passaggi in brodo peptonizzato puro e in brodo peptonizzato addizionato di una data dose di sublimato corrosivo.

Le dosi di sublimato corrosivo che ho aggiunto al liquido di cultura sono state quelle di 1:40000, 1:38000, 1:36000,

1 : 30000, 1 : 25000, 1 : 20000, 1 : 15000, 1 : 10000, 1 : 8000, 1 : 5000, 1 : 4000, 1 : 2000, 1 : 1000.

Il brodo puro come quello addizionato con dosi sempre crescenti di sublimato, fu fatto in grande quantità, perchè dovendo fare degli esperimenti di confronto, gli errori che potevano riscontrarsi nello studiare su di un dato microrganismo, fossero li stessi anche per tutti gli altri.

Preparato così il materiale di nutrizione sia pure, sia addizionato con sublimato corrosivo, prendevo una cultura in brodo di un dato microrganismo. Da questa cultura tenuta per 24 ore a una temperatura di 37° e di cui l'esame microscopico m'aveva fatto certo della purità, con una piccola ansa di platino che immergevo per tre volte di seguito nel liquido di cultura, facevo il trasporto in un'altra provetta di brodo puro e in un'altra provetta di brodo addizionato con una dose di Sublimato a 1 : 40000.

Le due nuove provette venivano messe in un termostato a una temperatura di 37°. Quando l'intorbidamento del liquido di cultura (che avveniva in generale dopo 24 ore) mi faceva certo dello sviluppo del microrganismo, allora ne facevo l'esame microscopico e di nuovo il trapianto dalla provetta in brodo puro in un'altra provetta di brodo puro e dalla provetta in brodo addizionata con una dose di 1 : 40000 di sublimato in un'altra di brodo addizionato con una dose di 1 : 38000. E così seguitando a passare a dosi sempre più forti, arrivavo ad un punto in cui una provetta, addizionata con una data dose di sublimato, non faceva scorgere intorbidamento di sorta nel brodo che vi era contenuto.

In questo caso allora prendevo con una siringa sterilizzata una discreta quantità di liquido, dopo avere agitato ben bene la provetta, e la passavo in una provetta di brodo puro. In questa maniera potevo meglio conoscere se quella data dose di antisettico, aggiunta al liquido di cultura, aveva ucciso il microrganismo che vi era stato trapiantato o pure ne aveva semplicemente arrestato il potere di riproduzione.

Per saggiare poi il grado di resistenza di un microrganismo che non aveva subito alcun adattamento, si prendeva una

Resultati ottenuti negli esperimenti fatti col Bacillo dell' Eresipela dei maiali

A	1:40000	1:38000	1:36000	1:30000	1:25000	1:20000	1:15000	1:10000	1:8000	1:5000	1:4000	1:2000	1:1000
B	+	+	+	+	+	+	+	+	+				
C	+	+	+	+	+								
D	+	+	+	+	+	+							

Resultati ottenuti negli esperimenti fatti col Bacillo del Carbonchio

A	1:40000	1:38000	1:36000	1:30000	1:25000	1:20000	1:15000	1:10000	1:8000	1:5000	1:4000	1:2000	1:1000
B	+	+	+	+	+	+	+						
C	+	+	+	+	+	+	+						
D	+	+	+	+	+	+							

Resultati degli esperimenti fatti col Colera dei polli

A	1:40000	1:38000	1:36000	1:30000	1:25000	1:20000	1:15000	1:10000	1:8000	1:5000	1:4000	1:2000	1:1000
B	+	+	+	+									
C	+	+	+	+									
D	+	+	+	+									

Nella colonna *A* sono indicate, in questi quadri, le dosi di sublimato corrosivo aggiunte al liquido di cultura. Le crocette segnate nella colonna *B* indicano la dose alla quale si è ottenuto lo sviluppo del microrganismo dopo passaggi successivi dalle soluzioni più deboli a quelle più forti. Le crocette della colonna *C* indicano fino a che dose si conserva il potere patogeno e quelle della colonna *D* fino a quale dose possono resi-

stere i microrganismi che provengono direttamente da cultura in brodo puro.

Dai quadri che precedono e nei quali ho compendiato per maggior semplicità tutti i risultati ottenuti nei miei esperimenti, si vede con evidenza come non tutti i microrganismi di cui mi sono servito nelle ricerche che mi ero proposto, abbiano la proprietà di potersi adattare nello stesso grado ad un dato antiseptico.

Il *Pneumococco di Friedländer* ad esempio, che ha presentato al massimo grado la proprietà di adattarsi ai mezzi di cultura addizionati di sublimato corrosivo fino ad arrivare a una dose approssimativa di 1 : 2000, differisce molto dal microrganismo del *Colera dei polli*, il quale può solamente adattarsi a una dose di 1 : 30000.

L'aumento di resistenza per un dato antiseptico, che questi microrganismi acquistano dopo che essi hanno vissuto in mezzi in cui questo stesso antiseptico entrava in piccole proporzioni, è reso evidente dagli esperimenti di confronto che ho fatti seminando con culture pure di un dato microrganismo i brodi addizionati di sublimato a dosi differenti.

Così si è visto che il *Bacillo di Friedländer*, che resiste fino a una dose 1 : 2000 quando venga coltivato precedentemente in brodi che contenevano dosi minori di sublimato, resta ucciso se da una cultura in brodo puro si trapianta subito in una provetta di brodo che contiene del sublimato nella dose di 1 : 15000. E i bacilli dell' *Eresipela dei maiali* che per adattamento arrivano a poter vivere in brodi cui è stato aggiunto il sublimato nella dose di 1 : 8000, restano uccisi se da culture in brodo puro si fanno passare in brodo addizionato con una dose di 1 : 15000 di antiseptico.

I microrganismi del *Colera dei polli*, che si sono mostrati i più sensibili all'azione del Biclورو di mercurio, non hanno invece acquistato nessuna maggiore resistenza contro l'antiseptico che entrava in piccola proporzione nel mezzo in cui venivano coltivati.

In quanto poi al potere patogeno di questi microrganismi che per adattamento hanno acquistato la proprietà di resistere

a dosi di antisettico nelle quali prima sarebbe loro stato impossibile di vivere, si vede che per la maggior parte dei microrganismi sperimentati, esso si mantiene finchè è compatibile la vita e la moltiplicazione dell'individuo.

Solamente il Bacillo dell'*Eresipela dei maiali*, perde il potere patogeno nel brodo che contiene il sublimato nelle proporzioni di 1:20000, mentre la sua vita è compatibile anche se questa dose arriva a 1:8000.

Da questi fatti credo di potere essere in grado di trarre le conclusioni seguenti:

1° *I microrganismi hanno in generale la proprietà di potersi adattare ai mezzi antisettici e acquistano contro questi mezzi una resistenza che prima non avevano. Questo aumento di resistenza non si riscontra in quei microrganismi che risentono troppo fortemente dell'influenza del mezzo. (Vedi Colera dei polli).*

2° *I microrganismi patogeni che hanno la proprietà di adattarsi ai mezzi antisettici, si comportano differentemente rispetto alla conservazione del loro potere patogeno. Questo infatti in alcuni si mantiene finchè si conserva la vita dell'individuo; in altri il potere patogeno si perde molto prima e si ha quindi una vera attenuazione.*

BIBLIOGRAFIA

- (1) *L. Marchand*, Botanique Cryptogamique, 2° fasc., pag. 407.
- (2) *Frisch*, Sitzungsberichte der Wiener Akademie, mag. 1877.
- (3) *L. Marchand*, Ibidem.
- (4) *O. Brefeld*, Botan. Untersuchungen über Schimmelpilze, IV.
- (5) *A. Fitz*, Berichte der Deutschen Chem. Gesellschaft, 1876-84.
- (6) *E. Duclaux*, Etude sur le lait. (Annales des l'Institut National agronomique, n. 5. Parigi 1882, pag. 22-138).
- (7) *Koch*, Mittheilungen aus dem Kaiserl. Gesundheitsamt, I, pag. 305.
- (8) *P. Van Thieghem*. Bulletin de la Soc. Botan. de France, tom. XXVII, (1881), pag. 35.
- (9) *Certes e Cochin*. (Comp. rend. de la Soc. de biol., 1884)
- (10) *Chamberland e Roux*, Sur l'attenuation de la bacteridie charbonneuse et de ses germes sous l'influence des substances antiseptiques. (Comp. rend. de l'Accad. 1883, 1° sem., pag. 1411).
- (11) *Bucholtz*, Antiseptica und Bakterien. (Archiv für experiment. Pathol., 1875, pag. 1-81).
- (12) *Kuhn*, Ein Beitrag zur Biologie der Bakterien. (Inaug. Dissert. Dorpat, 1879).
- (13) *Haberkorn*, Das Verhalten von Harn-Bakterien gegen einige Antiseptica. Dorpat, 1879.
- (14) *N. Jalan de la Croix*, Das Verhalten der Bakterien das Fleisch-Wasser gegen einige Antiseptica. (Arch. f. expr. Pathol., 175, 225).
- (15) *Koch*, Ueber Disinfection. (Ibid., I, 1881, 234-282).
- (16) *Sternberg*, The american journal of the Medical Sciences, 1883, aprile, pag. 322.
- (17) *B. Ratimoff*, Recherches sur les substances antiseptiques et des consequences qui en résultent pour la pratique chirurgicale. (Archives de Physiologie normale et pathologique, vol. IV, 1884, pag. 142).
- (18) *Raulin*, Recherches sur le développement d'une mucédinée dans un milieu artificiel. (Ann. de Sciences Naturelles, 1870).
- (19) *E. Wasserzug*, (Annales de Pasteur, febbraio-marzo 1888).
- (20) *Schottelius*, Ricerche biologiche sul Micrococco prodigioso. (Festschrift f. Alb. von Kölliker. Leipzig, 1887).
- (21) *Pasteur*, (Comptes rendus de l'Acad., 1881).
- (22) *Arloing*, (Archives de physiologie, 1886, pag. 232).
- (23) *Kossiakoff*, De la propriété que possèdent les microbes de s'accomoder aux milieux antiseptiques. (Annales de Pasteur, ottobre 1887).

Estratto dallo **Sperimentale**, anno XLVI (*Memorie Originali*, fasc. 1°).

